Institut für Anthropologie und Humangenetik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr.med. Dr.rer.nat. Horst Ritter

METHODIK, MUTTER – KIND – STATISTIK, POPULATIONSGENETIK ZUM POLYMORPHISMUS DER HAPTOGLOBIN UNTERGRUPPEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Rüdiger Ott
aus Stuttgart
1978

Institut für Anthropologie und Humangenetik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr.med. Dr.rer.nat. Horst Ritter

METHODIK, MUTTER – KIND – STATISTIK, POPULATIONSGENETIK ZUM POLYMORPHISMUS DER HAPTOGLOBIN UNTERGRUPPEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Rüdiger Ott
aus Stuttgart
1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Prof.Dr.med. H.J.Mallach
Berichterstatter:	Prof.Dr.rer.nat.Dr.med. H.Ritter
Korreferent:	Prof.Dr.med. W.Schneider

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. Einleitung und Ziel der Arbeit	3
II. Material und Methode	9
III. Ergebnisse und Diskussion	14
IV. Zusammenfassung	22
V. Literaturverzeichnis	24

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Ritter danke ich für die Überlassung des Themas und die Beratung bei der Abfassung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Biol. S. Bißbort und Herrn Dr. J. Kömpf für die wertvolle Unterstützung während des praktischen Teils dieser Arbeit.

I. Einleitung

Das Haptoglobin (Hp) ist ein Serumglykoprotein, das elektrophoretisch zur α_2-Fraktion gerechnet wird. Es hat die Fähigkeit, im Serum frei vorhandenes Hämoglobin (Hb) in einen Hp-Hb-Komplex zu transponieren.

Das Haptoglobin kommt im Serum Gesunder in einer Konzentration von 30 - 190 mg/100 ml vor, die Bindungskapazität für Hämoglobin beträgt 50 - 150 mg/100 ml Serum. (Nyman 1959 - (1)

Da das komplex gebundene Hb nicht mehr nierengängig ist, besteht eine physiologische Funktion des Hp darin, die Ausscheidung von freiem Hämoglobin über die Niere zu verhindern. Diese Komplexbildung gehört somit zu den Eisenspar-Mechanismen.

Weitere Stoffwechselfunktionen des Hp-Hb-Komplexes werden noch diskutiert. (Nakajima et al 1963) - (2)

In neuester Zeit wurde (Prokop 1977) - (3) dem Haptoglobin eine antikörperähnliche Funktion gegenüber Streptokokken zugeschrieben.

Die Haptoglobine wurden von Jayle und Polonowski (1938) - (4) als Bestandteile des menschlichen Serums erstmals erkannt. Jayle et al (1946) - (5) beschrieben verschiedene Haptoglobintypen, das Hp I und das Hp II, die durch das Molekulargewicht unterschieden werden. Der Nachweis eines genetisch bedingten Hp-Polymorphismus gelang erstmals Smithies (1955) - (6) mit der "Stärkegelelektrophorese". Mittels dieses Elektrophorese-Trägermediums gelang es, feinere Proteinauftrennungen herzustellen. Diese verfeinerte Methode ließ es nun zu, genetisch determinierte Elektrophorese-Varianten des Haptoglobins darzustellen. An Hand einer kleinen Familienserie stellte Smithies und Walker (1956) - (7) das genetische Modell des Hp-Polymorhismus auf:

2 Allele Hp^1 und Hp^2 an
einem autosomalen Locus.

Danach lassen sich drei Phänotypen, Hp 1-1, Hp 2-1, Hp 2-2, unterscheiden, die bei der Peroxydasereaktion verschiedene Zymogramm-Muster aufweisen.
Im Rahmen größerer Serien wurde von vielen anderen Autoren dieses Modell bestätigt.
Neben diesen drei häufigen Phänotypen wurden weitere seltene Hp-Varianten gefunden, für deren Zustandekommen Punktmutationen, ungleiche Crossing-over,

Chimären oder Mosaik-Karyotypen diskutiert werden.
(Übersicht siehe:

Humangenetik
ein kurzes Handbuch in fünf Bänden
herausgegeben von Peter Emil Becker
(Band I S. 64 Ritter, Jörgensen, Vogel
Thieme Verlag Stuttgart)

Durch eine weitere Methode - die reduktive Spaltung des aus menschlichem Serum rein dargestellten Haptoglobins mit nachfolgender Elektrophorese der Hp-Bruchstücke - kam Smithies zu einer weiteren Unterteilung der 3 häufigen Phänotypen in die sogenannten "Hp-Untergruppen" (Subtypes).
Zur Erläuterung dieses Sachverhaltes folgen einige molekulargenetische Grundtatsachen:
Das Hp-Molekül besitzt Tetramerstruktur; es besteht aus 2α - und 2β - Polypeptidketten, die von zwei unabhängigen Loci gesteuert werden, dem α-Locus und dem β-Locus. Für die β-Polypeptidketten wurde bisher keine genetisch determinierte Variabilität beschrieben. Der hier beschriebene Polymorphismus beschränkt sich auf die vom α-Locus gesteuerten Polypeptidketten (α-Ketten).
Nach reduktiver Spaltung des Tetramers in seine Primärstruktur, d.h. in einzelne α- und β-Ketten ergibt sich eine elektrophoretische Variabilität (Smithies

et al 1962a) - (8) der α-Ketten: hpα1F, hpα1S und hpα2. Somit werden also vom α-Locus 3 Alle-le $Hp^{\alpha 1S}$, $Hp^{\alpha 1F}$ und $Hp^{\alpha 2}$ determiniert. Auf den biochemischen Ablauf des "Subtyping" wird auf S.11 bei "Material und Methode" näher eingegangen.
Die Polypeptidketten von hpα1F und hpα1S weisen übereinstimmend 83 Aminosäuren auf mit einem Molekulargewicht von 9000. Sie unterscheiden sich jedoch in ihren Sequenzen in Position 54: für LYSIN in hpα1F steht GLUTAMIN in hpα1S - Folge einer Punkt-Mutation.
Dieser Aminosäure-Austausch hat eine Ladungsänderung zur Folge, somit besitzt hpα1F im sauren Milieu eine etwas größere elektrophoretische Beweglichkeit als hpα1S.
Smithies et al (1962b) - (9) erweiterten nach diesen Erkenntnissen das einfache "2-Allelen-Modell" zu folgendem 3-Allelen-Modell an einem autosomalen Locus:

3 Allele Hp^{1F}, Hp^{1S}, Hp^{2}.

Smithies erklärte das Zustandekommen des Hp^{2}-Gens durch partielle Genduplikation mit Duplikationsdefizienz, als Folge eines "unequal Crossing-over" zwischen Hp^{1F} und Hp^{1S} (Modell: 2+2=3+1).
Es entsteht die Polypeptidketteninformation Hp^{2FS}.
Weitere allelische Varianten müßten nach dieser Hypothese (Smithies und Nance 1963) - (10) zu erwarten sein. Durch ein homologes Crossing-over könnten beim

Genotypus Hp^{2FS}/Hp^{1S} und Hp^{2FS}/Hp^{1F} für die hp 2 Polypeptidketten die genetischen Informationen Hp^{2SS}, Hp^{2FF} und Hp^{2SF} bzw. Hp^{2FS} entstehen.
Formalgenetisch müßte dann ein 5-Allele-Modell gefordert werden.

Tabelle 1:

Darstellung der zu erwartenden Phänotypen in den verschiedenen formalgenetischen Haptoglobinmodellen.

Mögliche Phänotypen im:

2 Allele-	3 Allele-	5 Allele Modell
Hp 1 - 1	Hp 1F - 1F	Hp 1F - 1F
	Hp 1S - 1F	Hp 1S - 1F
	Hp 1S - 1S	Hp 1S - 1S
Hp 2 - 1	Hp 2 - 1F	Hp 2FF- 1F
	Hp 2 - 1S	Hp 2SF- 1F
		Hp 2SS- 1F
		Hp 2FF- 1S
		Hp 2FS- 1S
		Hp 2SS- 1S
Hp 2 - 2	Hp 2 - 2	Hp 2FF- 2FF
		Hp 2FF- 2SF
		Hp 2FF- 2SS
		Hp 2SF- 2SF
		Hp 2SF- 2SS
		Hp 2SS- 2SS

Die Darstellung der Hp-Globulin-Polypeptidketten und die reduktive Spaltung ihrer Disulfidbrücken (Subtyping), sowie die elektrophoretische Auftrennung ist bisher nur mit sehr aufwendigen Methoden möglich gewesen, so daß umfangreiche Untersuchungen nicht durchgeführt werden konnten. Zudem waren die Methoden mit einer beträchtlichen Fehlerbreite behaftet, die Resultate bei den verschiedenen Autoren dadurch recht widersprüchlich.

Ziel dieser Arbeit ist es:

1. Die Vereinfachung der Reindarstellung des Hp durch die "Batch-Absorption" anstatt der "Säulenchromatographie".
2. Die Optimierung der Stärkegelelektrophorese nach neuesten Gesichtspunkten.
3. Die Überprüfung des genetischen Modells an Hand einer "Mutter-Kind-Statistik".
4. Die Ermittlung der Genfrequenzen Hp 1F und Hp 1S an Hand einer populationsgenetischen Stichprobe aus dem südwestdeutschen Raum.

II. Material und Methoden

Zur Untersuchung kam hämolysefreies Plasma, das durch Venenpunktion gewonnen wurde.

Arbeitsvorschrift:

Die Gewinnung der Hp-Fraktion erfolgt durch Absorption an "Di-Ethyl-Amino-Ethylen-(DEAE) Cellulose", anschließendes Auswaschen der Fremdproteine und Elution des absorbierten Proteins.

A) Zubereitung der DEAE-Cellulose:

DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher
Typ DEAE 23 ss Kap. 0,73
Aus Nr. 24 075 Reinheit p.A.
der Firma Serva Feinbiochemica Heidelberg.

35 g Cellulose werden mit 0,01 M Natrium-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 4,6 aufgeschwemmt und auf 1 Liter aufgefüllt. Durch wiederholtes Decantieren wird sie von leichten Schwebstoffen befreit.

B) Präparative Darstellung des Haptoglobins:

1. Zur Absorption des Hp kommen 500 µl Serum mit 5 ml der vorbereiteten DEAE-Aufschwemmung für 15 Minuten bei Zimmertemperatur zur Reaktion.
2. Anschließend wird das Serum-Ionen-Austauschgemisch bei 4000 U/min 2 Minuten abzentrifugiert,

der Überstand wird verworfen.

3. Nun werden 8 ml 0,01 Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 4,6 hinzugefügt und die abzentrifugierte Zellulose wieder abgesetzt.
4. Den gleichen Vorgang wie in (3.) wiederholt man mit 0,03 M Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 4,6.
5. Die Elution des Hp wird mit 5 ml 0,125 M Ammoniumacetatlösung durchgeführt.
   Nachdem das Ammoniumacetat 15 Minuten eingewirkt hat, wird die DEAE-Cellulose bei 4000 U/min 5 Minuten lang abzentrifugiert.
6. Das Eluat (Überstand) wird nun in ein frisches Zentrifugenglas umgefüllt.
7. In dem Zentrifugenglas wird das Eluat mit 5 ml auf minus 20° C abgekühltem Aceton vermischt.
8. Nach 2 Stunden ist das Protein vollständig ausgefällt, es wird mit 4000 U/min 10 Minuten lang abzentrifugiert.
9. Das denaturierte Protein wird durch Evacuation vom Aceton befreit.
10. Die vom Aceton befreite Proteinfraktion wird durch Hinzufügen von 100 µl 8 M Harnstoff und 1,6 Vol.% Mercaptoäthanol in 0,2 M NaOH-Borsäure-Puffer pH 9 in ihre einzelnen Proteinketten reduktiv aufgespalten. Dieser Prozeß dauert bei Zimmertemperatur ca. 2 Stunden.

Biochemische Erläuterungen zum Subtyping:

Durch die 8-molare Harnstoffpufferlösung werden Van der Waal'sche Kräfte aufgehoben, Wasserstoffbrücken zwischen den Polypeptidketten werden gespalten.

Mit Hilfe von 2-Mercaptoäthanol werden Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten reduktiv gespalten. Die höheren Strukturen des Proteinmoleküls werden somit aufgehoben, nur die Primärstruktur, d.h. die Sequenzen der einzelnen Polypeptidketten bleiben erhalten.

C) Elektrophoretische Darstellung

Horizontale Stärkegelelektrophorese in NaOH-Ameisensäure-Puffer pH 2,7 bei 4 V/cm, 2° C und 17 Stunden Laufzeit.

1. Gelstammpuffer: 0,25 M NaOH-Ameisensäure-Puffer pH 2,7.

2. Gelherstellung: 240 ml Gelpuffer werden mit 254 g Harnstoff vermischt und 200 g Stärke *) in dieser Harnstoff-Gelpufferlösung suspendiert und ad 1400 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. Diese Suspension wird im Wasserbad bei 96° C unter ständigem Rühren in den leicht flüssigen Gelzustand übergeführt. Dieser Vorgang dauert ca. 18 Minuten.

*) Stärke der Firma
Connaught, Toronto

- Dem Gel werden nach dem Kochen noch 2 ml 2-Mercaptoäthanol untergerührt.
- Das noch flüssige Gel wird auf die isolierte Kühlplatte blasenfrei aufgetragen;
- ein Kamm wird in das Gel eingebracht (Zahnmaße: Höhe: 7 mm, Breite: 7 mm, Tiefe: 2 mm).
- Das Gel muß 2 Stunden unter Kühlung durchhärten, bevor der Kamm entfernt werden kann.
- In die so entstehenden Impfschlitze der einzelnen Kammzähne werden sodann 100 µl der Probe (B, 10.) eingebracht.

3. Brückenpuffer: 0,28 M NaOH-Ameisensäure-Puffer pH 3,7.
   - Der Brückenpuffer wird in zweikammrige Pufferschalen gefüllt (Kammerinhalt 1,25 Liter).
   - Der Anschluss an den Stromkreis wird über Platinelektroden und 8-schichtige Papierbrükken *) hergestellt.

*) Schleicher & Schlüll Nr. 23854

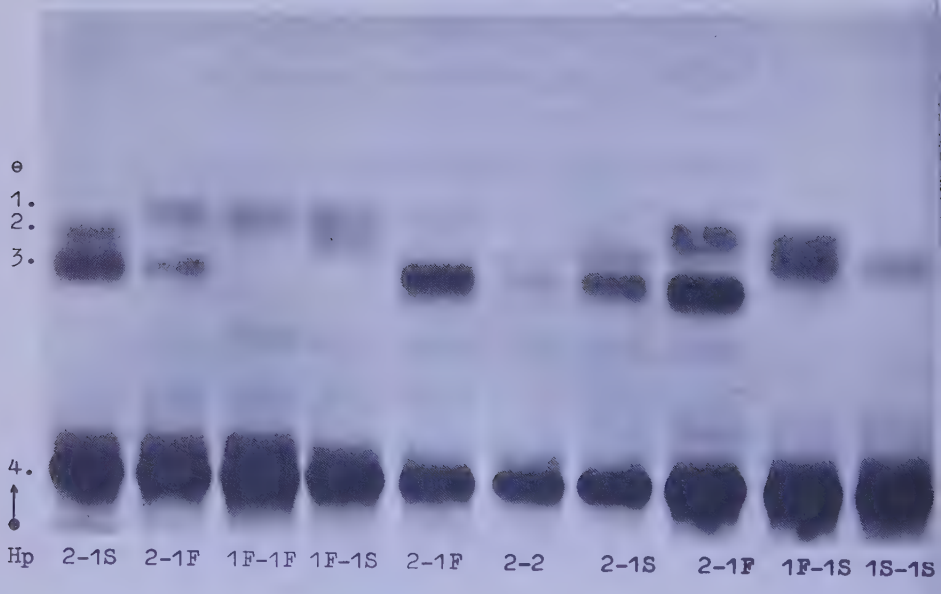
D) Schneiden und Färben des Gels

- Nach 17 Stunden haben die Hp-Proteinketten eine Strecke von 8 - 10 cm kathodisch zurückgelegt.
- Aus der Mitte des 0,8 cm dicken Gel-Blocks wird nun ein Gel-Block vom Format 11 x 19 x 0,2 cm herausgeschnitten.
- Die Färbung dieses Gel-Blocks erfolgt mit einer Coomassie Brillant Blue-Lösung (1,5% W/V C.Br.B., 75 ml Diaethylen-Glykol, 15 ml 7%ige Essigsäure).
- Die Farbstoffeinwirkung sollte 20 Minuten andauern.
- Das Gel wird sodann bis zur Darstellung der Banden mit einem Gemisch aus 70 Teilen 7%iger Essigsäure und 30 Teilen Äthanol entfärbt.

III. Ergebnisse und Diskussion

A) Elektropherogramm

der Haptoglobin Untergruppen



Zu (1.) Position der hpα1F Polypeptidkette
(2.) Position der hpα1S Polypeptidkette
(3.) Position der hpα 2 Polypeptidkette
(4.) Position der α_1 - Glykoproteinfraktion

Die elektrophoretischen Positionen wurden spezifisch nachgewiesen.
Eine Identifikation der Proteine wurde durchgeführt.
Die Aufnahme des Elektropherogramms wurde im Durchlicht vorgenommen.
Die homozygoten Phänotypen Hp 1F - 1F, Hp 1S - 1S und Hp 2 - 2 stellen sich mit einem "Einbandenmuster" in der Elektrophorese dar. Die elektrophoretische Migration zur Kathode ist für Hp 1F > Hp 1S > Hp 2. Die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit der Genprodukte hpα1F und hpα1S kann mit dem Aminosäureaustausch in Position 54 der Polypeptidketten erklärt werden, für die geringere Migration von hpα2 dürfte die fast doppelt so lange Polypeptidkette und die dadurch bedingte elektrophoretische Trägheit verantwortlich sein. Die Genprodukte hpα2 liegen somit der Anode am nächsten. Für die einzelnen Polypeptidketten hpα2, hpα1S, hpα1F gibt es also drei verschiedenene Positionen. Durch Kombination der verschiedenen Allele ergeben sich die auf dem Foto dargestellten Phänotypen:

Hp 2 - 2, Hp 2 - 1S, Hp 2 - 1F
Hp 1S - 1S, Hp 1F - 1S, Hp 1F - 1F.

B) Formalgenetik:

Mutter-Kind-Statistik
Erwartungswerte allgemein

Km \ Kd	1F-1F	1F-1S	1S-1S	2-1F	2-1S
1F-1F	p^3	p^2q	-	p^2r	-
1F-1S	p^2q	$pq(p+q)$	pq^2	pqr	pqr
1S-1S	-	pq^2	q^3	-	q^2r
2 -1F	p^2r	pqr	-	$pr(p+r)$	pqr
2 -1S	-	pqr	q^2r	pqr	$qr(q+r)$

Tabelle 2a zeigt in allgemeiner Darstellung die Verteilung der Gene Hp 1F und Hp 1S.

Das formalgenetische Modell lautet:

3 Allele, $Hp^{\alpha 1F}$, $Hp^{\alpha 1S}$ und $Hp^{\alpha 2}$

an einem autosomalen Locus.

Mutter-Kind-Statistik

Beobachtungswerte
Erwartungswerte - p=o,13 q=o,27 r=o,6o 2n=238 -

Km \ Kd	1F-1F	1F-1S	1S-1S	2-1F	2-1S
1F-1F	0 0,5	0 1,1		0 2,4	
1F-1S	0 1,1	5 6,1	1 2,3	0 5,0	4 5,0
1S-1S		2 2,3	6 4,7		13 17,4
2 -1F	3 2,4	8 5,0		17 13,6	6 5,0
2 -1S		5 5,0	15 17,4	5 5,0	29 33,5

Tabelle 2b zeigt die Verteilung der Gene Hp 1F und Hp 1S bei Mutter und Kind; es traten keine Phänotypen auf, die nach dem genetischen 3-Allelenmodell nicht erwartet werden dürfen.
Die Beobachtungs- und Erwartungswerte weichen nur zufällig von einander ab.

$\chi^2 = 4{,}79$ df = 16 97,5%>p>95%

C) Populationsgenetik:

- Genfrequenzen der Hp-Untergruppen -

Genfrequenzen für Hp 1 und Hp 2 wurden seit der Entdeckung des Polymorphismus für beinahe alle Rassen und Populationen mitgeteilt. So wurde für Hp 2 bei Mitteleuropäern eine durchschnittliche Genhäufigkeit von 0,6 ermittelt. (Übersicht siehe Handbuch Becker S. 75)

Demgegenüber wurden seit der Entdeckung der Hp-Untergruppen immer nur kleine Stichproben untersucht. So ist es auch nicht verwunderlich, daß die Angaben der verschiedenen Autoren stark von einander abweichen. Z.B. werden Genfrequenzen für Europide für Hp 1F zwischen 0,046 und 0,306 mitgeteilt. (Handbuch Becker S. 85)

Für die Abweichungen werden diskutiert:

1. methodische Schwierigkeiten,
2. statistische Fehler und kleine Stichproben,
3. Isolations- und Selektionsmechanismen.

Tabelle 3 zeigt die von einigen Autoren ermittelten Genfrequenzen für die Gene Hp^{1F} und Hp^{1S} in unterschiedlichen europiden Populationen:

Autor	Stichprobe (n)	Hp^{1F}	Hp^{1S}	Hp^{2}	Methode
Smithies et al 1962 (8)	93 Kanadier	0,160	0,240	0,600	SGE*)
Giblett und Brooks 1963 (12)	66 Europäer	0,133	0,251	0,616	SGE
Kehr, Löke, Weyrauch 1966 (13)	212 Deutsche (Südwestdeutschl.)	0,209	0,201	0,590	SGE
Cleve 1966 (14)	232 Deutsche (Hessen)	0,144	0,261	0,595	SGE
Ehnholm 1969 (15)	100 Finnen	0,140	0,222	0,638	SGE
Constans und Viau 1975 (16)	351 Franzosen (Toulouse)	0,170	0,200		PAE‡)
Hever 1976 (17)	343 Ungarn (Budapest)	0,130	0,215	0,651	SGE

*) Stärkegel-Elektrophorese

‡) Polyacrylamid-Elektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurden 398 nicht verwandte Personen aus dem südwestdeutschen Raum untersucht. Nur eindeutig ablesbare Hp-Untergruppenbestimmungen kamen zur Auswertung.
Die Häufigkeit der Gene Hp^{1F} und Hp^{1S} wurde mit der Genzählmethode ermittelt (von 398 Personen wiesen 136 das Allel Hp^{1F} auf).

Tabelle 4

Phänotypen- und Allelhäufigkeit
im südwestdeutschen Raum
(formales Modell: 3 Allele Hp^{1F}, Hp^{1S}, Hp^{2})

(n) Stich-probe	Phänotypen					Allelhäufigkeit		
	2 -1S	2 -1F	1S-1S	1S-1F	1F-1F	Hp^{1S}	Hp^{1F}	Hp^{2}
398								
Beobachtet	121	61	35	29	9	0,27	0,13	0,60
Erwartet	128,9	62,1	29,0	27,9	6,7			

$\chi^2 = 2,56$ df = 4 70% > p > 60%

Die Erwartungswerte wurden unter Annahme von Hardy-Weinberg-Bedingungen berechnet.

Die hier vorliegenden Untersuchungen ergaben eine doppelt so große Häufigkeit des Allels Hp^{1S} gegenüber Hp^{1F}.

In allen europiden Populationen zeigen sich recht gute Übereinstimmungen der Genhäufigkeit für Hp^{1S} und Hp^{1F}.

So z.B. bei Giblett 1963
Cleve 1966
Ehnholm 1969
Hêver 1976

(Vergl. Tabelle 3)

Die bisher einzige Arbeit im südwestdeutschen Raum wurde von Kehr-Löke und Weyrauch 1966 angefertigt. Es wurden 212 Personen untersucht. Die Häufigkeit der Allele Hp^{1F} und Hp^{1S} wurde mit 0,209 zu 0,201 angegeben, somit wurde eine ungefähr gleich·häufige Genverteilung in dieser Arbeit gefunden.

Bei Weyrauch werden methodische Schwierigkeiten angegeben. Seine Hauptschwierigkeiten bestanden in der sehr schwer zu standardisierenden Haptoglobindarstellung und der Differenzierung der Phänotypen im Elektropherogramm der vertikalen Stärkegelelektrophorese.

Die Genfrequenz für Hp^2 stimmt mit dem Durchschnittswert 0,6 für Europa gut überein.
Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur formalen Genetik erlauben die Auswertung nach dem "3-Allele-Modell".
Die von Nance und Smithies (10) beschriebenen hp 2-Polypeptidketten-Variationen konnten nicht dargestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine vereinfachte, routinemäßig durchführbare Methode dargestellt, die es erlaubt, in kurzer Zeit die "Subtypes" sicher zu bestimmen.
Durch das "Batch-Verfahren" im Reagenzglas ist es möglich, sicher und schnell das Haptoglobin ohne Störfraktion zu gewinnen.
Die verfeinerte Elektrophoresetechnik: Erhöhung der Pufferkapazität mit daraus resultierender schärferer Bandendarstellung ermöglicht eine exakte Typisierung der Hp-Untergruppen.
Diese Methode wird es nun erlauben, Untersuchungen im Hp-Untergruppensystem mit großen Populationen durchzuführen.

IV) Zusammenfassung

A) Durch die Stärkegelelektrophorese konnten drei verschiedene Haptoglobin-Phänotypen dargestellt werden, die durch ein formales 2-Allelen-Modell ausreichend erklärt wurden.

Duch die reduktive Spaltung des Hp-Moleküls mit nachfolgender elektrophoretischer Auftrennung der Bruchstücke konnte Smithies et al (1962) zum ersten Mal die sogenannten Hp-Untergruppen (Subtypes) darstellen. Diese Untergruppenbestimmung zwang zur Hypothese eines "3-Allele-Modells" mit 3 Allelen: Hp^{1F}, Hp^{1S} und Hp^{2} am autosomalen Locus Hp .

B) Darstellung des Haptoglobins aus 0,5 ml menschlichem Serum durch das "Batch-Absorptionsverfahren" (Modifikation der Methode von Steinbuch und Quentin 1961) - (11), Fällung des Proteins und nach reduktiver Spaltung Darstellung der Phänotypen mit Hilfe der horizontalen Stärkegelelektrophorese in Ameisensäure-NaOH-Puffer pH 2,4.

C) Untersuchungen zur Formal- und Populationsgenetik. Das formalgenetische "3-Allele-Modell" mit den allelen Genen Hp^{1F}, Hp^{1S} und Hp^{2} wurde an Hand einer Mutter-Kind-Statistik geprüft.

Nachden vorliegenden Ergebnissen kann weiterhin mit einem 3-Allele-Modell gearbeitet werden; es traten keine Phänotypen auf, die mit diesem Modell nicht erklärt werden konnten.
Die Genfrequenzen wurden für Hp^{1F} und Hp^{1S} anhand einer Stichprobe von 398 Probanden aus dem südwestdeutschen Raum bestimmt.

V. Literaturverzeichnis

14. CLEVE, H.:
Die Verteilung der Haptoglobin-Untergruppen in einer Stichprobe gesunder Blutspender aus Hessen.
Hum. Genet. 2, 115 (1966)

16. CONSTANS, J., VIAU, M.:
Distribution of Haptoglobin Subtypes in French Basques.
Hum. Hered. 25, 156 (1975)

15. EHNHOLM, C.:
The distribution of haptoglin subtypes in the Finnish population.
Hum. Hered. 19, 222 (1969)

12. GIBLETT, E.R., BROOKS, L.E.:
Haptoglobin subtypes in three Racial Groups.
Nature 197, 576 (1963)

17. HEVER, Ö.:
Haptoglobin Subtypes in Hungary
Hum. Hered. 26, 324 (1976)

5. JAYLE, M.F., O. JUDAS:
Formule Glycoprotéidique du plasma sanguin
Helv. chim Acta 29, 1310 (1946)

4. JAYLE, M.F., POLONOWSKI, M.:
Existence dans le plasma sanguin d'une substance activant l'action peroxydasique de l'hemoglobine
C.R. Soc. Biol. 129, 457 (1938)

13. KEHR-LÖKE, E.R., WEYRAUCH, U., RITTER, H., GOEDDE, H.W.:
Untersuchungen zur Populationsgenetik der Haptoglobin-Untergruppen
Blt 14, 97 (1966)

2. NAKAJIMA, H.:
Studies on heme α-methenyl oxygenase, an new enzyme which is capable of transforming haemoglobin-haptoglobin to a possible precursor of biliverdin.
Proc. 9th Congr. Eur. Soc. Haematology, Lisbon, p. 840, Karger, Basel (1963)

1. NYMAN, M.:
Serum haptoglobin. Methodological and clinical studies.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 11, suppl. 39 (1959)

3. PROKOP, O.: (1977)
Vortrag auf dem
7. Internationalen Kongreß für forensische Blutgruppenkunde - Hamburg 24.- 29.9.1977

6. SMITHIES, O.:
Zone elektrophoresis in starch gels: grop variations in the serum proteins of normal human adults
Biochem. J 61, 629 (1955)

8. Smithies, O., G.E. CONNELL, G.H. DIXON:
Inheritance of Haptoglobin Subtypes
Amer. J. hum. Genet. 14, 14 (1962a)

9. SMITHIES, O. G.E. CONNELL, G.H. DIXON:
Chromosomal Rearrangements and the Evolution of Haptoglobin Genes
Nature 196, 232 (1962b)

10. SMITHIES, O., NANCE, W.E.:
New Haptoglobin Alleles. A Prediction confirmed.
Nature 198, 869 (1963)

7. SMITHIES, O., N.F. WALKER:
Notation for Serum-Protein Groups and the Genes controlling their Inheritance
Nature 178, 694 (1956)

11. STEINBUCH, M., QUENTIN, M.:
Isolation of Haptoglobin by Chromatography on Diethylaminoethyl-Cellulose (DEAE)
Nature 190, 1121 (1961)

An Übersichtswerken wurde verwandt:

1. Genetic Markers in Human Blood
Eloise R. Giblett M.D.
Blackwell Scientific Publications

2. The Principles of Human Biochemical Genetics
Harry Harris
North-Holland Publishing Company

3. HUMANGENETIK
Ein kurzes Handbuch in fünf Bänden
Herausgegeben von Peter Emil Becker
Band I Thieme Verlag Stuttgart

L E B E N S L A U F

Am 11. Juni 1948 wurde ich, Rüdiger Ott, als Sohn des Erich Ott und dessen Ehefrau Eleonore, geb. Haas, in Stuttgart geboren.

- Im Frühjahr 1969 Schulabschluß mit dem Abitur.

- Ab Sommersemester 1971 Studium der Medizin.

- Von 1975 bis Anfang 1977 Bearbeitung des experimentellen Teils dieser Dissertation.

- Am 11. Januar 1977 Abschluß des Medizinstudiums mit dem Staatsexamen an der Universität Tübingen.

- Seit März 1977 Medizinalassistent an den Tübinger Kliniken.

STUDENTENWERKSDRUCK–RÜMELINSTRASSE 8 – 7400 TÜBINGEN 1